

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100447422 B1  
(43)Date of publication of application: 26.08.2004

(21)Application number: 1019960058826  
(22)Date of filing: 28.11.1996

(71)Applicant: CJ CORP.  
(72)Inventor: KIM, HYEON SU  
OH, MYEONG SEOK  
LEE, DONG EOK  
YOO, RI AN  
HA, BYEONG JIP  
KIM, SEOK JUN  
PARK, JI SUK

(51)Int. Cl. C12N 5 /06

(54) CULTURE MEDIUM FOR GLYCOSYLATION OF GLYCOPROTEIN DERIVED FROM MAMMAL CELLS AND IMPROVEMENT OF ITS PRODUCTIVITY CONTAINING RETINOIC ACID AND BUTYRIC ACID AS EFFECTIVE COMPONENTS

(57) Abstract:

PURPOSE: A culture medium for glycosylation of glycoprotein derived from mammal cells and improvement of its productivity is provided, thereby improving in vivo biological activity and bio-availability and production yield of glycoprotein. CONSTITUTION: The culture medium for glycosylation of glycoprotein derived from mammal cells and improvement of its productivity comprises 0.05 picomole to 200 micromole of retinoic acid and 0.05 picomole to 2 micromole of butyric acid as effective components, and has pH 8.5 to 9.0, wherein the butyric acid is sodium butyrate; and the glycoprotein is erythropoietin.

copyright KIPO 2005



Legal Status

Date of request for an examination (20011010)  
Notification date of refusal decision (00000000)  
Final disposal of an application (registration)  
Date of final disposal of an application (20040817)  
Patent registration number (1004474220000)  
Date of registration (20040826)  
Number of opposition against the grant of a patent ( )  
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)  
Number of trial against decision to refuse ( )  
Date of requesting trial against decision to refuse ( )

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 5/06

(45) 공고일자 2004년10월28일  
(11) 등록번호 10-0447422  
(24) 등록일자 2004년08월26일

(21) 출원번호	10-1996-0058826	(65) 공개번호	10-1998-0039738
(22) 출원일자	1996년11월28일	(43) 공개일자	1998년08월17일

(73) 특허권자 씨제이 주식회사  
서울특별시 중구 남대문로5가 500번지

(72) 발명자 김현수  
서울특별시 강동구 길 2동 43 신동아아파트 32동 707호

오명석  
서울특별시 성동구 광장동 광나루 현대아파트102동 1802호

이동익  
서울특별시 강남구 수서동 삼익아파트 405동 602호

유리안  
경기도 과천시 별양동 주공아파트 410동 1305호

하병집  
경기도 용인군 수지면 풍덕천리 수지 삼성 2차아파트 201동 803 호

김석준  
서울특별시 영등포구 양평동 1가 219-14

박지숙  
서울특별시 중랑구 묵 2동 249-54호

(74) 대리인 김석중  
최규팔

심사관 : 안규정

(54) 포유동물세포유래성당단백질의당쇄화및생산성향상성을위한새로운세포배양배지

요약

본 발명은 유전자 재조합 방법에 따라 동물세포로부터 유래하는 당단백질을 생산하고자 단백질 생산용 세포주를 대량으로 배양하는 경우에, 당단백질의 당쇄화 향상에 따른 생체내 이용률 및 생산 수율을 개선시키기 위한 목적으로 레티노산 및 부티르산 또는 그의 염을 함유시킨 새로운 세포배양배지에 관한 것이다.

대표도

도 1

## 도면의 간단한 설명

제 1 도는 세포배양배지의 pH 상승에 따른 당단백질 생산농도의 증가양상을 나타낸 것이고,  
 제 2 도는 소듐부티레이트가 첨가된 세포배양액에서 생산된 당단백질 농도의 증가양상을 나타낸 것이며,  
 제 3 도는 레티노산이 첨가된 세포배양액에서 생산된 당단백질의 당쇄화 향상정도를 나타낸 것이고,  
 제 4 도는 소듐부티레이트가 첨가된 세포배양액에서 생산된 당단백질의 당쇄화 향상정도를 나타낸 것이다.

## 발명의 상세한 설명

## 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유전자 재조합 방법에 따라 동물세포로부터 유래하는 당단백질을 생산하고자 단백질 생산용 세포주를 대량으로 배양하는 경우에, 당단백질의 당쇄화 향상에 따른 생체내 이용률 및 생산 수율을 개선시키기 위한 목적으로 레티노산 및/또는 부티르산염을 함유시킨 새로운 세포배양배지에 관한 것이다.

유전자 재조합 기술에 의해 생산되는 당단백 의약품이 생체에 투여된 후 분자구조의 안정성 및 높은 생물학적 활성을 유지하기 위해서는 번역 후 변형 (post-translational modification) 및 당쇄화(glycosylation)과정이 매우 중요하다. 그러나, 이러한 당쇄화과정은 미생물내에서는 불완전하거나 거의 이루어지지 않기 때문에 동물세포를 이용한 대량 배양방법이 당단백질을 생산하기 위한 중요한 생산공정으로서 자리잡았다.

당단백질의 당쇄화 과정은 소포체(endoplasmic reticulum)와 골지체에 존재하는 다양한 엑소글리코시다아제(exoglycosidase) 및 글리코실 트랜스퍼라아제(glycosyl transferase)에 의하여 수행되는 것으로 알려져 있으며(참조: C.F Gooch, M.J. Gramer, D. C. Andersen, J.B. Bahr and J.R. Rasmussen Biotechnology, 1991, 9, 1347-1354), 특히 다당구조(Oligosaccharide structure)에서 말단에 결합되는 시알산(sialic acid)은 자기면역반응 등의 부작용을 피할 수 있게 해주고, 간에 존재하는 아시알로글리코프로테인(asialoglycoprotein) 수용체에 의한 당단백질의 소실을 방지하여 혈중내 반감기를 최대화시키는데 매우 중요한 작용을 한다 (참조: E. Goldwasser, C K-H Kung and J. Eliason. J. Biol. Chem, 1974, 249, 4202-4210). 이와 같이 중요한 작용을 하는 시알산의 결합은 골지체중에 존재하는 시알릴트랜스퍼라아제(sialyltransferase)에 의하여 수행된다. 즉, 당쇄화 과정은 일련의 효소반응에 의해 수행되며, 완벽한 당쇄화 과정이 이루어지기 위해서는 각 단계마다 적합한 효소의 활성화가 필수적인 것이다.

이에, 본 발명자들은 유전공학적 방법으로 재조합 당단백질을 생산하는 경우에 숙주세포로서 포유동물세포를 사용하는 것 이외에도 당쇄화 과정에 참여하는 일련의 효소들을 활성화시키고 아울러 단백질 프로세싱(processing) 및 분비를 촉진시킬 수 있다면 보다 높은 생물학적 활성을 지닌 당단백질을 고수율로 생산할 수 있으리라는 점에 착안하여 이 목적을 위해 집중적인 연구를 수행하였으며, 그 결과 단백질 생산용 세포주를 배양하는 과정에서 레티노산 및/또는 부티르산염을 세포배양배지에 첨가하면 이러한 목적을 달성할 수 있음을 발견하고 그 효과를 직접 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 이하, 본 발명의 구성을 좀더 상세히 설명한다.

본 발명은 레티노산 및/또는 부티르산염을 함유함을 특징으로 하는 새로운 세포배양배지에 관한 것이다. 이와 같은 구성을 취함으로써 본 발명에 따른 세포배양배지는 재조합 당단백질의 당쇄화 및 생산수율을 증가시킬 수 있다.

본 발명에 따른 세포배양배지에서 유효성분으로 사용한 레티노산은 동물세포의 배양시 당쇄화에 관계하는 일련의 효소들을 활성화시키는 작용을 할 수 있으며 부티르산은 단백질 프로세싱 및 분비에 관련하는 GRP(Glucose regulated proteins) 및 PDI(protein disulfide isomerase)의 발현을 향상시킬 수 있으므로, 본 발명에서는 이들을 세포배양배지에 함유시킴으로서 재조합 단백질의 당쇄화 및 생산수율을 높이기 위한 수단으로 사용하였고 이에 따라 높은 생체내 생물학적 활성 (in vivo biological activity)을 갖는 당 단백질의 생산수율을 극대화시키는데 성공하였다.

즉, 제 3 도 및 4 도의 결과로부터 알 수 있듯이, 세포배양배지에 레티노산을 첨가하면 보다 낮은 등전점(isoelectric point)을 갖는 당단백질의 함량이 증가하는데, 이는 당쇄 말단에 시알산을 포함하는 당단백질의 함량이 보다 증가한 것을 의미하며, 부티르산염(예를들어, 소듐부티레이트)을 첨가한 경우에도 당단백질의 당쇄화가 향상되고 있다. 또한, 제 2도는 세포배양배지중에 부티르산염을 첨가한 경우에 시일 경과에 따른 당단백질 생산성의 향상정도를 나타낸 것인데, 이로부터 부티르산염을 첨가하면 대조군에 비하여 13 내지 211%의 범위에서 다양하게 생산성이 증대되고 있음을 알 수 있다.

이러한 목적으로 레티노산을 첨가하는 경우에 세포배양배지중의 레티노산의 함량은 0.05pM 내지 20μ M의 농도로 유지시키는 것이 바람직하고, 부티르산염은 0.05pM 내지 2mM의 농도로 유지시키는 것이 바람직하다.

한편, 본 발명에 따른 세포배양배지의 pH를 8.5이상으로 조정하여 사용하면 시알리다아제(sialidase)에 의하여 최종 생산물인 시알화 단백질(sialy protein)으로 부터 시알산이 제거되는 것을 억제할 수 있으므로, 세포배양배지의 pH는 8.5 내지 9.0으로 유지시키는 것이 바람직하다. 제 1 도는 세포배양배지의 pH를 8.5 및 7.8로 각각 조정한 배양

배지중에서 단백질 생산용 세포를 배양한 다음, 단백질의 생산성을 측정한 결과를 나타낸 것인데, 이로부터 pH 를 8.5 조정 한 경우에 pH 7.8의 대조군에 비하여 25% 정도 생산성이 증가됨을 알 수 있다.

본 발명에 따른 세포배양배지를 적용하여 생산하고자 하는 당단백질의 종류를 한정할 필요는 없으며, 유전자 재조합 방법에 따라 당단백질을 생산하고자 하는 경우라면 어떤 경우는 적용가능하다. 본 발명을 적용하기에 바람직한 당단백질의 대표적인 예로는 생체내에서 적혈구 생성 자극인자로서 작용을 하며, 전체 분자량의 약 40%가 다당구조로 되어 있는 에리트로포이에틴(Erythropoietin; 이하, 'EPO'라 한다)를 언급할 수 있으며, 이하의 실시예에서는 이 당단백질을 대상으로 하여 본 발명에 따른 세포배양배지의 효과를 확인하였다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1: 배지조성의 변화에 따른 당단백질 생산량의 증가

EPO 를 생산할 수 있도록 형질전환된 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary: CHO)세포를 175cm<sup>2</sup> 세포배양 플라스크 또는 490cm<sup>2</sup> 롤러 버틀에 1x10<sup>5</sup> 세포/ml 밀도로 분주한 다음, 여기에 소태아혈청(GIBCO BRL) 3% 가 함유된 DMEM/F12 배지(GIBCO BRL) 40 내지 80ml 를 첨가하였다. 음성대조군으로는 pH 가 7.2 내지 7.8로 조정된 것을 사용하였고 양성대조 I 군으로는 pH가 8.5 내지 9.0으로 조정된 것을 사용하였다. 이때, pH 를 8.5 내지 9.0 으로 조정하기 위하여 헤페스소듐염(HEPES sodium salt) 및 중탄산나트륨(Sodium bicarbonate)을 혼합사용하였다. 사용된 배지에 농도범위는 모두 10 내지 3mM이었다. 양성대조 II군에는 레티노산을 최종농도가 0.5 내지 20μM 이 되도록 첨가하였으며, 양성대조 III 군에는 소듐부티레이트를 최종농도가 0.05 내지 2mM이 되도록 첨가하였다. 37℃의 CO<sub>2</sub> 배양기 또는 항온실에서 각 배지중의 세포를 배양하였으며, 세포가 증식하고 있는 세포배양 플라스크 또는 롤러 버틀에서 배지를 1 내지 3 일 마다 교환하면서 배지를 회수하였다.

상기한 바와 같이 다양한 조성을 갖는 배지에서 세포를 배양한 다음, 세포 배양배지를 900×g 에서 원심분리하여 수득한 상등액 100μl 검체로 하여 세포내에서 생산된 EPO 단백질의 양을 효소면역학적 분석법(ELISA)에 따라 다음과 같이 확인하였다. 96 웰 플레이트의 각 웰마다 PBS(Phosphate Buffered Solution) 1ml 당 5μg의 항 EPO 단일클론 항체를 100μl씩 넣고 37℃에서 2시간 동안 부착시켰다. 항체용액을 제거하고 PBST(Phosphate buffered solution 에 tween을 0.05% 녹임)로 4회 세척하였다. 각 웰마다 검체를 100μl씩 넣고 37℃에서 2 시간동안 반응시켰다. 그 후 PBST로 4회 세척한 후 5μg/ml 의 항 EPO 다가항체를 100μl씩 넣고 37℃에서 2 시간동안 반응시켰다. 다시 PBST로 4회 세척한 후 200mU/ml 퍼옥시다아제 콘쥬게이트 이뮤노글로불린 G (peroxidase conjugate immunoglobulin G)를 100μl 씩 넣고 37℃에서 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척 후 1mg/ml 농도의 o-페닐렌디아민(Phenylene diamin; OPD)을 100μl씩 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. 1N 황산 50μl 를 가하여 반응을 종료시킨 후 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 용량 반응 기준 곡선은 국제표준 EPO를 계대화시킨 것을 사용하였다.

그 결과, pH가 8.5 내지 9.0 인 경우 pH 7.2 내지 7.8 의 음성대조군에 비하여 EPO 생산성에 있어서 25.1%의 증가를 나타내었으며(제 1 도 참조), 소듐부티레이트를 배지중에 첨가한 경우에는 소듐부티레이트를 첨가하지 않은 경우에 비해 13 내지 211%의 EPO 생산성 증가를 나타내었다(제 2도 참조).

#### 실시예 2: 배지내 레티노산 첨가에 의한 EPO 당쇄화 향상

레티노산을 첨가하여 세포배양배지내 최종농도가 0.5 내지 20μM 되도록 조정 한 후 실시예 1 에서와 동일한 조건에서 세포를 배양하였다. 세포배양액으로부터 유리된 EPO 의 당쇄화 향상정도는 등전 포커싱(isoelectric focusing)분석법에 따라 다음과 같이 확인하였다.

먼저, 등전 포커싱 분석을 위하여 30ml 의 세포배양액을 정제하였다. 즉, 항 EPO 단일클론항체를 결합시키고 시안화 브로마이드에 의해 활성화된 세파로오스(CNBr-activated sepharose)-4B 3ml 를 충전시킨 칼럼에 원심분리한 세포 배양 상등액을 통과시킨 후 10ml 의 PBS 를 통과시켰다. 칼럼물질과 비특이적으로 결합한 단백질을 제거하기 위하여 0.5M 염화나트륨이 포함된 PBS를 통과시킨 후, 0.1M 구연산 10ml 로 용출시켜 280nm에서 흡광도를 나타내는 분획을 수거하였다. 수거한 분획의 pH 를 1N 수산화나트륨 수용액을 사용하여 7.0 으로 조정 한 다음, 10mM Tris 용액(pH7.5)에서 투석하고 농축시켜 20μl 부피로 만들었다.

이러한 방법으로 다양한 세포 배양액으로부터 정제한 EPO 10μl 를 pH 3 내지 10 의 IEF 샘플 완충액(Novex Experimental Technology, San Diego, CA, U.S.A) 10μl 와 혼합한 후, pH 3 내지 10의 IEF 겔에서 100V로 1시간, 200V로 1시간, 500V로 30분간 전개시키고 쿠마시브릴리언트블루 0.1%, 메탄올 50%, 빙초산 10%가 포함된 용액중에서 30분간 염색하였다. 그 후, 메탄올 10% 및 빙초산 10%를 함유하는 용액중에서 16시간 동안 탈색시킨 후 80℃의 젤 건조기에서 3시간 동안 건조시켰다(제 3 도 참조).

그 결과 레티노산을 세포배지에 첨가한 경우(lane 4 와 5)에는 음성대조군(lane 7 와 8)에 비하여 낮은 등전점을 갖는 EPO 단백질 함량이 증가함을 확인할 수 있었는데, 이와 같이 낮은 등전점을 갖는 EPO 는 당쇄화 말단에 많은 시알산을 포함하고 있음을 의미한다.

#### 실시예 3: 배지내 소듐부티레이트 첨가에 의한 EPO 당쇄화 향상

세포배양배지내에 소듐부티레이트를 첨가하여 최종농도가 0.05 내지 5mM이 되도록 조정 한 후 실시예 1에서와 동일한 조건에서 세포를 배양하였다. 세포배양액으로부터 유리된 EPO 의 당쇄화 향상정도를 락틴을 이용한 효소면역학적 분석법에 의해 확인하였다. 이때, 2종의 락틴을 사용하였는데 하나는 마키아 아류렌시스 루코아글루티닌(Maackia amurensis leukoagglutinin; MAL로 표시)으로 킴플렉스 타입의 N-연결 다당체에서 3분지 또는 4분지 말단에 존재하는 α 2,3 시알산과 특이적으로 결합하는 락틴이며, 나머지 하나는 리시누스 코뮈니스 특신으로 킴플렉스 타입의 N-연결 다당체에서 3분지 또는 4분지 말단에 존재하는 유당과 특이적으로 결합하는 리신(RIC 로 표시)이다. 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

96 웰 플레이트의 각 웰마다 PBS에 5μg/ml 의 농도로 녹인 항 EPO 단일클론항체를 100μl씩 넣고, 37℃에서 2 시간동안 부착시켰다. 항체용액을 제거하고, 1시간 동안 실온에서 3% 젤라틴이 포함된 TBS(Tris Buffered Solution)

로 비특이적 반응을 차단시켰다. 그 후 PBST 용액(2.5mM Sodium dihydrogen orthophosphate, 7.5mM Sodium hydrogen orthophosphate, 0.5mM Sodium chloride, 0.05% Tween 20, pH 7.2) 200 $\mu$ l 로 4회 세척한 다음, PBS T 용액으로 적절하게 희석한 검체 100 $\mu$ l를 가하고 실온에서 3시간동안 조용히 흔들면서 반응시켰다. 다시 PBST 용액으로 3회 세척한 후 바이오틴(biotin)으로 표지된 MAL 또는 RIC 를 PBST 용액으로 100 또는 1500 배 희석하여 100 $\mu$ l씩 넣고 실온에서 2 시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 다시 PBST로 4회 세척하고 아비딘-홀스래디쉬퍼옥시다아제 100 $\mu$ l를 첨가하였다. 15 분간 반응시킨 후 다시 PBST로 4회 세척하고 과산화수소수 0.4%가 포함된 0.1M 구연산-인산 완충액(pH 5.0)에 오르토펜렌디아민 1mM이 용해된 용액을 100 $\mu$ l 가하여 실온에서 15 내지 30분간 색조 반응을 일으킨 다음, 3M 황산 50 $\mu$ l로 반응을 정지시켰다. 플레이트 리더를 이용하여 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준물질로는 EPO 국제표준품을 사용하였으며, 리신을 이용한 효소면역학적 분석에서는 EPO 국제표준품 (National Institute of biological standard) 50U를 50mM 소듐아세테이트(pH 5.0) 용액에 용해시키고 10U/ml 시알리다아제(Boehringer Mannheim) 2 $\mu$ l를 가하여 반응액 용량을 100 $\mu$ l로 한 것을 37℃에서 2시간 반응시킨 다음 사용하였다.

MAL 을 이용한 효소면역학적 분석에서 측정된 흡광도를 RIC를 이용한 효소면역학적 분석에서 측정된 흡광도로 나눈 값 (MAL-ELISA/RIC-ELISA, M/R로 표시)을 비교함으로써 시알산의 함유정도를 상대 비교하였다(제 4 도 참조). 제 4 도에서 막대 아래 왼쪽 막대그래프는 MAL-ELISA 에서의 흡광도(M)을, 오른쪽 막대그래프는 RIC-ELISA 에서의 흡광도(R)을 나타낸다. 막대 위의 수치는 MAL-ELISA 에서의 흡광도를 RIC-ELISA 에서의 흡광도로 나눈 값으로서, EPO 분자 내의 시알산과 유당과의 상대적 함량비를 나타내는데, 실험 결과 소듐부티레이트를 첨가한 경우에는 첨가농도에 비례하여 더 높은 M/R 값을 나타내었으며 이로부터 소듐부티레이트를 첨가한 경우에 EPO의 당쇄화가 향상되었음을 확인할 수 있었다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

레티노산 또는 부티르산염을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 당단백질의 당쇄화 향상을 위한 세포배양배지.

##### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, pH 가 8.5 내지 9.0 인 세포배양배지.

##### 청구항 3.

제 1 항 또는 2 항에 있어서, 레티노산의 함량이 0.05pM 내지 200 $\mu$  M 범위인 세포배양배지.

##### 청구항 4.

제 1 항 또는 2 항에 있어서, 부티르산염의 함량이 0.05pM 내지 2mM 범위인 세포배양배지.

##### 청구항 5.

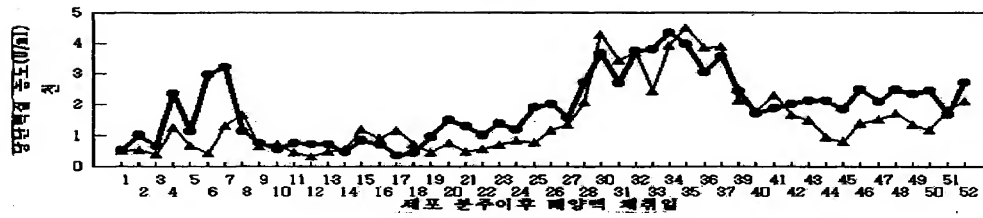
제 4 항에 있어서, 부티르산염이 소듐부티레이트인 세포배양배지.

##### 청구항 6.

제 1 항에 있어서, 당단백질이 에리트로포이에틴(EPO)임을 특징으로 하는 세포배양배지.

도면

도면 1

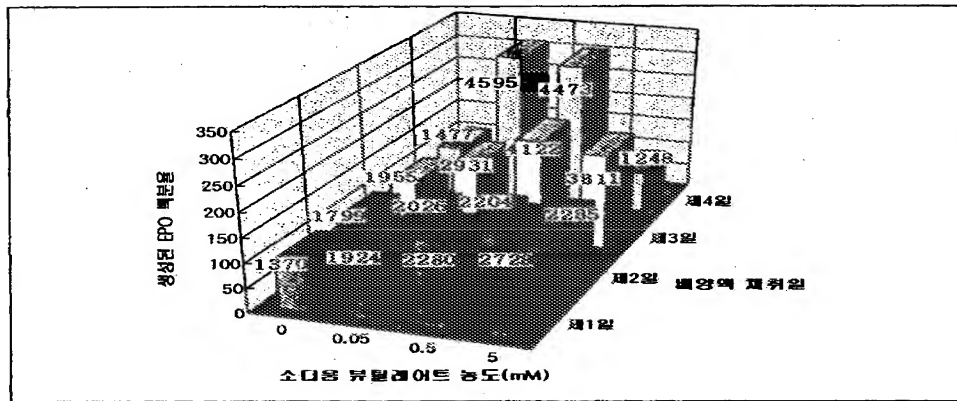


제 1 도는 세포배양배지의 pH 변화에 따른 당단백질 생산성의 증가정도를 나타낸 것이다.

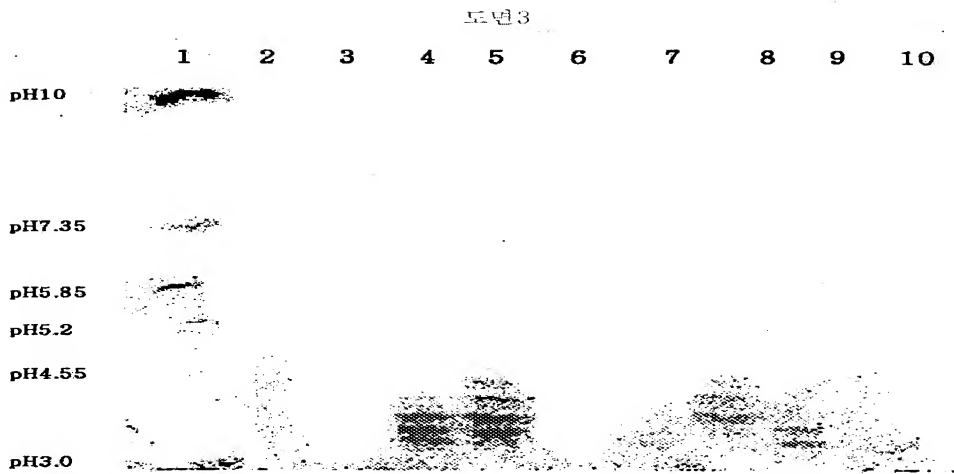
△ : 세포배양배지 pH 7.8

● : 세포배양배지 pH 8.5

도면 2



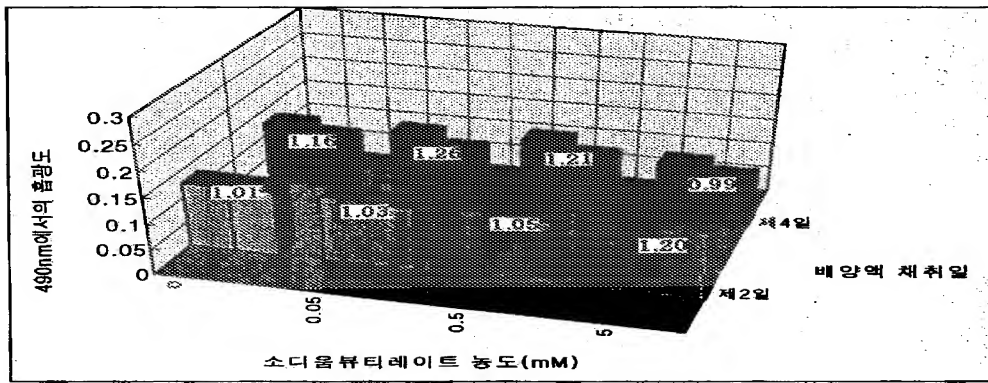
제 2 도는 소듐부티레이트가 첨가된 세포배양액중에서 생산된 당단백질의 농도증가양상을 나타낸 것이다.



제 3 도는 레티노산이 첨가된 세포배양액에서 생산된 당단백질의 당쇄화 향상 정도를 나타낸 것이다.

- lane 1 : 등전점 마커(Isoelectric point marker)
- lane 2 : 항 EPO 단일클론항체를 이용하여 정제한 EPO
- lane 3 : 0.5  $\mu$ M 레티노산을 첨가한 후 1 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 4 : 0.5  $\mu$ M 레티노산을 첨가한 후 3 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 5 : 0.5  $\mu$ M 레티노산을 첨가한 후 8 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 6 : 레티노산을 첨가하지 않고 1 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 7 : 레티노산을 첨가하지 않고 3 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 8 : 레티노산을 첨가하지 않고 8 회차 배양회수액에서 정제한 EPO
- lane 9 : 제일제당주식회사의 EPO 제품
- lane 10 : 베링거 만하임(Boehringer Mannheim)사의 EPO 제품

도면 4



제 4 도는 소듐뷰티레이트가 첨가된 세포배양액에서 생산된 당단백질의 당쇄화 향상 정도를 나타낸 것이다.